

⑫ 公開特許公報(A)

平1-120284

⑤ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)5月12日

C 12 N 7/04
A 61 K 39/21
C 07 K 13/00
15/04

8717-4B
7252-4C
8318-4H
8318-4H

審査請求 未請求 発明の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 HIV不完全粒子および該製造方法

⑮ 特 願 昭62-278290

⑯ 出 願 昭62(1987)11月5日

⑰ 発 明 者 加 藤 四 郎 大阪府吹田市藤白台4-23-7
⑰ 発 明 者 生 田 和 良 大阪府吹田市山田東3-18-1-117
⑰ 出 願 人 加 藤 四 郎 大阪府吹田市藤白台4-23-7
⑰ 出 願 人 生 田 和 良 大阪府吹田市山田東3-18-1-117
⑰ 代 理 人 弁理士 戸田 親男

明 細 書

(従来技術)

1. 発明の名称

HIV不完全粒子および該製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 主構成蛋白質として gp160 様物質および/またはその断片を有し、 gag 遺伝子にコードされた蛋白質および/または pol 遺伝子にコードされた蛋白質を全くあるいはほとんど含まず、かつ細胞によって産生される HIV 不完全粒子。

(2) HIV を細胞に感染させ、その中から死滅を逃れた細胞で、かつ HIV 不完全粒子を産生する細胞を取得し、培養し、次いで培養液から HIV 不完全粒子を製造する方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、感染力がないため、ワクチンなどの医薬品に利用可能な HIV 不完全粒子およびその製造方法に関するものである。

本発明でいう HIV とはヒト免疫不全ウイルス(Human Immunodeficiency Virus)のことであり、エイズ(AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome)の原因ウイルスのことを指し、HTLV-III、LAVなどのウイルスを包含する。HIV はレトロウイルスの一種であり、通常主としてヒトTリンパ球のうちCD4陽性細胞に感染し、細胞を破壊し、患者に重篤な免疫不全状態を惹起し、遂には死に至らしめるウイルスである。エイズを治療するための薬剤や感染防止を目的とするワクチンの開発は世界中で精力的に進められているが、その背景にはウイルスと細胞の培養技術の進歩が挙げられる。その内容はまず、HIV の検出と定量が培養細胞を用いて可能となったことである。即ち、HIV に感受性の高いヒトTリンパ球由来の細胞株を樹立し、HIV を感染させることによって起こる細胞増殖の抑制や細胞変性効果を測定するこ

とによってHIVを検出、定量できるようにになった。次に、この系とは対照的にHIVが感染しても細胞が持続的に増殖を継続するHIVの持続感染培養細胞系が開発されたことである。この技術は例えば Koyanagi, Y. et al. Selective cytotoxicity of AIDS virus infection towards HTLV-I-transformed cell lines. *Int. J. Cancer* 36, 445-451 (1985)に述べられているが、急性リンパ性白血病(ALL)由来の細胞株では、HIV感染後、多くの細胞が死滅を逃れ、HIVを放出しながら継続培養が可能な細胞になるというものである。この技術は感染力のあるHIVを大量かつ安定に採取し、HIV感染者の抗体の測定やワクチンなどの原料として用いる上で重要なものである。尚、ここでいう感染力とはHIV自体に帰属する性質をいうのであり、HIVに対して感受性が強い細胞に結合し、細胞内に侵入して複製し、その細胞の増殖を抑制、ひいては死滅させるか、細胞

を変性させる能力をいう。

HIVに対して感受性が強い細胞としてはMT-2細胞、MT-4細胞などがある。ワクチン原料としてのHIVは適当な処理によって弱毒化ないしは不活化され、生ワクチンまたは不活化ワクチンとして使用され得る。また一方ではHIVを構成する成分のうち、ヒトの体内で抗体ができ易い蛋白質を単離したり、遺伝子工学的または化学的に合成したHIVの一部構成成分を用いた、いわゆる成分ワクチンが検討されている。この場合、HIV構成蛋白質のうち、中和抗体誘導に重要な免疫原性の高い外被蛋白質などをリボソームに組込ませるなどして用いられている。

不完全な形態のHIVについてはドーナツ型粒子が知られている。これは電子顕微鏡の所見として観察されているに過ぎないが、完全なHIV粒子に一部混在して見出されており、コア構造が認められない粒子として報告されている(中井益代、AIDSウイルス粒

子の形態構造とその形成過程、細胞工学5 No.13 1137-1145(1986))。

(発明が解決しようとする問題点)

HIVを大量に取得し、医薬品などの用途に供しようとする場合は、当然のことながらHIVの感染性が問題となる。体外診断用医薬品や研究用試薬として用いる場合もさることながら、特にワクチンなどの治療薬として体内に投与する場合は、深刻な問題を惹起する可能性がある。例えば弱毒化したウイルスを使用する生ワクチンでは復帰変異によって病現性が回復する危険性があるし、不活化処理によって製した不活化ワクチンでは、不活化されずに残ったHIVと不活化による効果の減少の問題がある。また、成分ワクチンでは構成成分の状態が天然のものとは異なるために免疫原性の低下などが実用上の障壁となっている。従って、天然のHIVに極めて近く、強い免疫原性を有し、かつまた感染力のないHIV不完全粒子の解明と、それを大量

に製造し得る方法の開発が待たれていた。

HIV不完全粒子の一つとして知られているドーナツ型粒子については、単に現象的にとらえられているだけで、物質的性状は単にコア構造が認められていないだけであり、詳細については全く知られていない。さらに感染力の有無さえも不明である。この粒子は通常極く少量が自然発生的に出現するのみので、共存する完全なHIV粒子から単離精製することも困難であり、大量に生産することもできない。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、上記の問題点を解決するために種々探究した結果、感染力がなくさらに大量かつ安定に産生可能なHIV不完全粒子を見出したものである。本発明のHIV不完全粒子とは、本来HIVが宿主細胞内で増殖するために必要なgag遺伝子および/またはpol遺伝子にコードされた蛋白質を全く含まないか、あるいはほとんど含まないとい

う性質をもつ反面、主構成蛋白質として免疫原性のあるgp160様物質および／またはその断片であるgp120様物質などを含み、細胞によって粒子状またはその断片の形で産生されるものである。以上の物質的性状に照らせば、該HIV不完全粒子が弱毒性または不活化されたHIVや、細胞による産生が不可能なHIV構成成分を保持したリボソームのような組成物とは異なることは明らかである。ここでいうgag遺伝子およびpol遺伝子とはHIVの遺伝子の一部であり、gag遺伝子によってコードされる蛋白質とはHIV内部の「コア」構造を作るために必要な蛋白質、即ちp17やp24のことを指し、pol遺伝子によってコードされる蛋白質とは、HIVが宿主細胞内でHIVのRNAに対応するDNAを合成するために必要な逆転写酵素などを指す。またgp160およびgp160の断片であるgp120、gp41とはHIVの外被（エンベロープ）に存在す

-4/HIV細胞は工業技術院微生物工業技術研究所への寄託を申請したが、受理されなかった。HTLV-ⅢまたはLAVのいずれを用いても同様な結果が得られた。これらのクローンは培養上清中にHIV不完全粒子を大量に産生する。そこで次にこの産生されたHIV不完全粒子の性状について分析した結果を図1に示した。分析方法は、³⁵S-システインで標識した細胞の培養上清を25%蔗糖層を用いる超遠心、および蔗糖層を用いない超遠心によって完全HIV粒子のみを含む画分、および完全HIV粒子とHIV不完全粒子を含む画分とに分け、それぞれの画分に対しp17に反応する抗体とgp120に反応する抗体の両者を含むHIV感染患者の血清を反応させた。次いで生じた免疫沈降物を溶解し、トデシル硫酸ナトリウムを含むポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）にかけた。図1はそのフルオログラフイー像を示す。対照としてはHIVに持続感染

する糖蛋白質である。なお、gp120とgp41は、通常gp160として合成された後、分離するとされている。さらにここでいうgp160様物質、gp120様物質とは電気泳動的にHIVの、gp160、gp120の泳動する位置付近に各々泳動し、かつ抗HIV抗体に対して同様に反応する糖蛋白質のことをいう。

次に、本発明のHIV不完全粒子についてさらに詳しく述べる。

HIV感染後、広範な細胞死を呈する細胞株として既知のMT-4細胞（ヒトTリンパ球由来でHTLV-Ⅰによりトランスフォームした細胞）があるが、本発明者らはHIV感染MT-4細胞の中に見出される極めて少数の生残細胞に着目し、これらの細胞を増殖させるために培養を継続した結果、ついにこれらの細胞の増殖に成功し、さらにクローニングを実施して純粋なクローンであるMT-4/HIVを得ることができた。尚、該MT

し、感染性HIVを放出しているMOLT-4細胞を用いて同様の処理を行った。図1においてレーン1、2は対照のMOLT-4細胞についての結果であり、レーン3、4は本発明者らが得たクローン（MT-4/HIV）の細胞での結果である。またレーン1、3は完全HIV粒子のみによる反応、レーン2、4は完全HIV粒子とHIV不完全粒子とによる患者血清との反応を示す。レーン3で認められるように、p17、gp120、gp160に対する如何なる反応も観察されないことから、本発明者らが得たクローンの細胞が産生しているのは完全HIV粒子ではなく、HIV不完全粒子のみであり、しかもレーン4の結果からそのHIV不完全粒子はgp120に対する抗体と反応するgp120様物質とその前駆体と思われるgp160様物質を有するものであること、および、p17が検出できないことが判明した。

また、別の方法で該HIV不完全粒子が逆

転写酵素を有するか否かを調べたところ、該酵素活性は検出できなかった。従って、該HIV不完全粒子はgag遺伝子にコードされる蛋白質とpol遺伝子にコードされる蛋白質を全く含まないか、またはほとんど含まないことが明らかになった。これは電子顕微鏡による観察でもHIV不完全粒子内部に「コア」様構造が認められないことから裏付けられた。しかし、本発明のHIV不完全粒子は、gag遺伝子およびpol遺伝子にコードされた蛋白質の両方を常に同時に欠いている必要があるわけではなく、いずれか一方を含まない場合や、ほとんど含まない場合でも良いのである。尚、ここでいうほとんど含まない場合とは、HIVが未来有している感染力を発揮し得ない程度の含量をいう。また、HIV不完全粒子の形態は粒子状であってもまたはその断片であっても良いことはいうまでもない。ここで示したのはHIVのうちHTLV-Ⅲの感染後樹立したMT-4細胞由

による方法、あるいはこれらを適宜組み合わせることによって目的を達することができる。

本発明のHIV不完全粒子の用途としては感染性がなく、免疫原性が高いHIVワクチンとしての用途のほかに、血清中のHIV抗体検査のための抗原としての利用、または細胞に対する結合活性に着目して抗ウイルス薬のスクリーニングやHIV感染細胞に薬剤を注入するためのキャリアーとしても利用される。

【実施例1】

10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地中でMT-4細胞を培養し、 1×10^6 cells/mlとなったところでHIV (HTLV-Ⅲ) を0.1 m.o.i. で感染させた。4日後、細胞の98%以上が変性、死滅したが、15日後、生残細胞の増殖が認められ、約1ヶ月後には元のMT-4細胞に近い増殖を示すようになった。ここでクローニン

本のクローニン (MT-4/HIV) での結果であるがLAVを感染させた場合でも同様の結果が得られた。即ち、使用するHIVの種類によって何ら限定されることはなく同様なHIV不完全粒子が得られるのである。一方MOLT-4細胞については、通常は完全なHIV粒子を主として産生するがHIV不完全粒子を産生する可能性は否定できず、従って適切な処理によってHIV不完全粒子を放出するクローンを単離できることも否定し得ない。

本発明のHIV不完全粒子の感染性は、 $10^{0.4}$ TCID₅₀/ml以下であり、蛍光抗体法でも検出できなかった。従って、該HIV不完全粒子の感染力は全くないか、あるいはほとんどないと判断された。

該HIV不完全粒子を産生細胞の培養液から取得する方法としては、種々の方法が応用し得る。例えば産生細胞の培養液を遠心で分取する方法や、分子ふるい、限外ろ過など

グを行い、8クローンを得た。これらのクローンが培養上清に放出するHIV不完全粒子は48 K rps、2時間の遠心で25%蔗糖液層を通過せず、蔗糖液層を用いない48 K rps、1時間の遠心で沈降回収された。また回収されたHIV不完全粒子のMT-4細胞に対する感染性は、蛍光抗体法による検出限界以下であった。免疫沈降法では抗p17抗体と反応する蛋白質は認められず、抗gp120抗体と反応する蛋白質が認められた。電子顕微鏡による観察では「コア」構造を認め得ないウイルス状粒子が確認できた。

(発明の効果)

本発明によるHIV不完全粒子は感染力がなく、その構成成分および構造において天然のHIVの外被に極めて類似しているため、安全で、天然のHIV外被に近い免疫原性が期待される。従って本発明は、たとえばエイズの発症予防のためのワクチン等の医薬品としての利用が考えられる。

4. 図面の簡単な説明

図1は、本発明のHIV不完全粒子のSDS-PAGEの泳動図（フルオログラフィー法）である。

代理人 弁理士 戸田親男

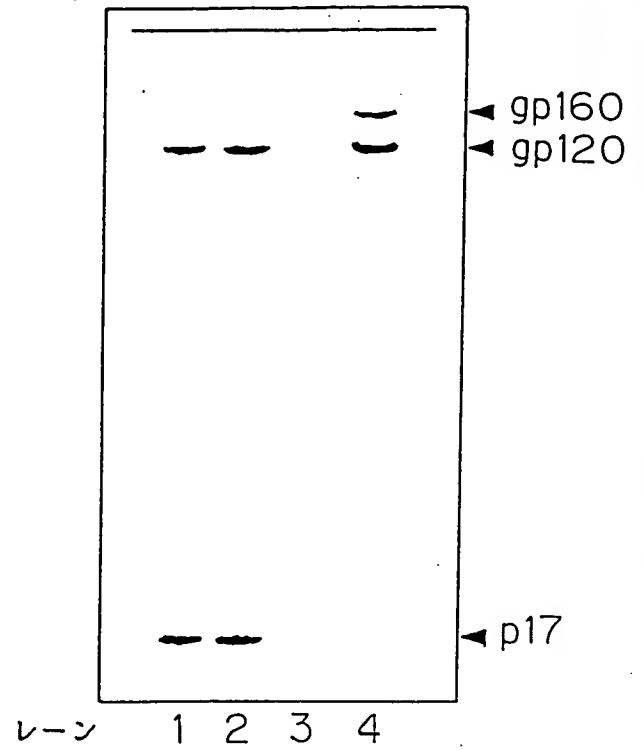


図 1